

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/035778 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/37, G01N 33/53, 33/573, 33/58, 33/68, 33/96
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2002/010816
- (22) 国際出願日: 2002 年 10 月 18 日 (18.10.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立循環器病センター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE PRESIDENT OF NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER) [JP/JP]; 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮田 敏行 (MIYATA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府吹田市古江台 3 丁目 13-3-801 Osaka (JP). 小亀 浩市 (KOKAME, Koichi) [JP/JP]; 〒565-0875 大阪府吹田市青山台 3-5-0-D12-106 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUBSTRATES SPECIFIC TO VON WILLEBRAND FACTOR CLEAVING PROTEASE AND METHOD OF ASSAYING THE ACTIVITY

(54) 発明の名称: フォンビルブランド因子切断酵素の特異的基質および活性測定法

(57) Abstract: Substrates specific to a von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS-13; and diagnosis of a patient with ADAMTS-13 deficiency, diagnostic compositions and kits with the use of the same. Particularly preferable ADAMTS-13 substrate polypeptides involve the one ranging from the amino acid 1587 to the amino acid 1668 and the one ranging from the amino acid 1596 to the amino acid 1668 in SEQ ID NO:1 in Sequence Listing. These ADAMTS-13 substrate polypeptides have each a high substrate specificity, excellent quantification properties and an adequate size for the recombination method.

(57) 要約: 本発明は、フォンビルブランド因子切断酵素 ADAMTS-13 の特異的基質、ならびにそれらを用いる ADAMTS-13 欠損患者の診断、診断用組成物、およびキットに関する。特に好ましい ADAMTS-13 基質ポリペプチドは配列表の配列番号: 1 のアミノ酸 1587 から始まり、アミノ酸 1668 で終わるもの、およびアミノ酸 1596 から始まり、アミノ酸 1668 で終わるものである。これらの ADAMTS-13 基質ポリペプチドは基質特異性が強く、定量性にも優れ、組み換え法による製造に適したサイズである。

WO 2004/035778 A1

## 明 細 書

## フォンビルブランド因子切断酵素の特異的基質および活性測定法

## 5 発明の属する技術分野

本発明は、血漿蛋白の切断酵素、詳細には、フォンビルブランド因子切断酵素の特異的基質および活性測定方法、ならびにフォンビルブランド因子切断酵素活性のハイスループット測定系に関する。

## 10 従来の技術

フォンビルブランド因子（以下、「VWF」という）は、血液凝固において重要な役割を果たす血漿蛋白質である。VWFは主に血管内皮で合成され、高分子多量体の形態で血中に放出される。通常、血漿中のフォンビルブランド因子切断酵素（ADAMTS-13あるいはVWF-CPと呼ばれており、以下、「ADAMTS-13という」）によって適度な大きさに限定分解されることで、その凝固促進活性が調節されている。ADAMTS-13の活性が著しく低下した場合、VWFの異常高分子化が起こる。その結果、特に血小板の過剰凝集による血栓が生じ、血栓性血小板減少性紫斑病（以下、「TTP」という）と呼ばれる重篤な全身性疾患を引き起こす。TTPは、先天性と後天性に大別される。

近年、ADAMTS-13が単離され、それをコードする遺伝子ADAMTS13が同定された<sup>(1)</sup>。この遺伝子の変異は、先天性TTPの原因となる。一方、TTPの大半を占め、妊娠や薬剤の副作用等で誘発される後天性TTPの発症機構は解明されていない。

TTPは、血小板減少を伴う血栓性の全身性疾患であり、放置すればほぼ確実に死に至る。血漿交換の有効性が知られて以来、致死率は著しく減少した。しかしながら、2～3週間に1度の血漿交換は患者にとって大きな負担であり、感染等の危険も無視できない。そこで、ADAMTS-13活性を正確かつ迅速に測定し、血漿交換のタイミングを正確に判断し、血漿交換の回数を減少させ、かつ治療効果を増大させることが必要となっている。また、後天性TTPの予知にも

ADAMTS-13活性の正確な測定が不可欠である。ADAMTS-13の正確な活性測定により、TTP発症の副作用を有する薬剤の服用時や、TTPを誘発しやすい妊娠時等に血中ADAMTS-13活性を定期的に測定し、それが低下していないか、すなわち、TTP発症の徴候が現れていないか、といった臨床情報を得ることが可能となる。また、ADAMTS-13の活性低下を根拠に、患者がTTPにかかっていることの確定診断を迅速に行なうこともできる。

TTPとよく似た臨床的症状を示す疾病としてHUS（溶血性尿毒症症候群）がある。しかしながら、HUS患者においてはADAMTS-13活性は正常レベルであり、TTP患者におけるADAMTS-13活性の低下または欠失とは対照をなす。したがって、患者のADAMTS-13活性を的確に測定することによって、TTPとHUSとを識別することもできる。

ADAMTS-13は、VWFサブユニットのTyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>間のペプチド結合を特異的に切断する<sup>(2)</sup>。この部位を特異的に切断する酵素はADAMTS-13以外に知られていない。現在、ADAMTS-13の活性測定法として、(i) 精製ヒトVWFを基質とした反応液の電気泳動とウェスタンブロットの組み合わせ<sup>(3)</sup>、(ii) VWFのコラーゲン結合能の測定<sup>(4)</sup>、(iii) VWF部位特異的モノクローナル抗体を利用した定量<sup>(5)</sup>などが知られている。しかしながら、操作に時間や熟練を要する、定量性に欠ける、感度が低い、などといった欠点があり、さらに簡便性、多検体処理能にも欠けるものであり、臨床現場への普及は困難である。また、プロテアーゼ活性のハイスループット測定系として広く普及している発色性あるいは蛍光性合成ペプチド基質の利用は、ADAMTS-13の場合、基質特異性の問題から不可能であるといわれている<sup>(6)</sup>。

#### 発明が解決しようとする課題

上述のごとく、ADAMTS-13活性の低下により引き起こされるTTPが非常に重篤な疾患であるにもかかわらず、ADAMTS-13活性の正確かつ迅速な測定法が未だ確立されていないのが現状である。したがって、本発明は、従来のADAMTS-13活性測定法の欠点を克服し、TTPの効果的な治療およびTTP発症予知、TTPの確定診断、およびTTPとHUSの識別等に資する

ことを課題とするものである。

#### 発明が解決しようとする課題

上記事情に鑑みて、本発明者らは鋭意研究を重ねたところ、配列番号：1に示す野生型ヒトVWFのアミノ酸配列の1605番目のチロシンと1606番目のメチオニンとの間の切断部位（以下、 $\text{Tyr}^{1605}-\text{Met}^{1606}$ と表記することがあり、単に「切断部位」という場合がある）を含む、成熟VWFサブユニットの末端切断された比較的短い部分アミノ酸配列またはその変異配列であっても、ADAMTS-13により特異的に切断されることを見出し、簡便、特異的、高感度かつ定量的にADAMTS-13活性を測定することに成功し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、

(1) 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸764から1605のうちの1つから始まり、アミノ酸1606から2813のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド（ただし、配列表の配列番号：1のアミノ酸764から始まり、アミノ酸2813で終わるものを除く）、

(2) 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459から1605のうちの1つから始まり、アミノ酸1606から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド、

(3) 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459から1600のうちの1つから始まり、アミノ酸1611から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド、

(4) 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1554から1600のうちの1つから始まり、アミノ酸1660から1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチド、

(5) 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1587から始まり、アミノ酸1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチド、

(6) 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1596から始まり、アミノ酸1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチド、

5 (7) 上記(1)ないし(6)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドに対して少なくとも50%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、

(8) 上記(1)ないし(6)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドに対して少なくとも70%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、

10 (9) 上記(1)ないし(6)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドに対して少なくとも90%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、

(10) 上記(1)ないし(6)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドのアミノ酸配列において、1個ないし数個のアミノ酸の欠失、挿入、置換または付加（あるいはこれらの組み合わせ）により、上記(1)ないし  
15 (6)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドとは異なっているものである変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、

(11) N末端および／またはC末端にタグ配列が結合している上記(1)ないし(10)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、  
20

(12) タグが蛋白、ペプチド、カップリング剤、放射性標識、発色団からなる群より選択されるものである上記(11)に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、

(13) タグが固相に固定化するためのものである上記(11)または(12)に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、  
25

(14) 固相に固定化された上記(13)に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド、

(15) 上記(1)ないし(14)のいずれかに記載のADAMTS-13基

質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドと正常対象から得た血漿とを接触させて、生成するポリペプチド断片を分析してこれを対照とし、上記(1)ないし(14)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドと対象から得た血漿とを接触させて生成するポリペプチド断片を同様に分析し、対照と比較することを特徴とする、対象中のADAMTS-13活性測定方法、

(16) 上記(1)ないし(14)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを用いることを特徴とする、対象から得た血漿中のADAMTS-13活性のハイスループット測定方法、

(17) 上記(1)ないし(14)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを含む、対象におけるADAMTS-13活性低下または欠失をインビトロで調べるための診断組成物、

(18) 上記(1)ないし(14)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを必須構成成分として含む、対象におけるADAMTS-13活性低下または欠失をインビトロで調べるためのキット、ならびに

(19) 上記(17)に記載の診断組成物または上記(18)に記載のキットを製造するための、上記(1)ないし(14)のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドの使用を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、GST-Asp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Glu<sup>1554</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1587</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-HおよびGST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1659</sup>-Hを正常血漿と37℃で2時間反応させ、SDS-PAGEで分離した後、抗GST抗体を一次抗体として用いたウェスタンブロットを行なった結果を示す。

図2は、 $\text{GST-Asp}^{1596}-\text{Arg}^{1668}-\text{H}$ の基質特異性および反応の定量性を示す。反応条件は図1と同じである。

### 発明の詳細な説明

5 野生型ヒトVWFは、そのシグナルペプチドおよびプロ領域を含めて全部で2813個のアミノ酸からなるポリペプチドである。野生型ヒトVWFのアミノ酸配列を配列表の配列番号：1に示す。野生型ヒト成熟VWFサブユニットはそのシグナルペプチドおよびプロ領域を除いた部分であり、配列表の配列番号：1のアミノ酸764からアミノ酸2813までのポリペプチドである。そのアミノ酸  
10 の番号付けは、野生型ヒトVWFのアミノ（N）末端の開始メチオニンを1（アミノ酸1）としてカルボキシル（C）末端方向に順に数えていく（配列表の配列番号：1参照）。本明細書において、例えば、配列表の配列番号：1のN末端から1459番目のアミノ酸をアミノ酸1459と表示することがある。さらに配列表の配列番号：1のN末端から1459番目のアミノ酸はアスパラギン酸（ $\text{Asp}$ ）  
15 であるので、 $\text{Asp}^{1459}$ と表示することがある。また例えば、アミノ酸1459（ $\text{Asp}$ ）からアミノ酸1668（ $\text{Arg}$ ）までのポリペプチドを $\text{Asp}^{1459}-\text{Arg}^{1668}$ と表示することがある。

「野生型」VWFのアミノ酸配列は、変異していないヒトのVWFのアミノ酸配列を意味する。本明細書において、「変異」している旨を特記しないかぎり、  
20 「野生型」の表示がなくてもアミノ酸配列は変異していないものである。

したがって、本明細書においては、ヒト成熟VWFサブユニットの部分アミノ酸配列が、その部分に対応する天然型ヒト成熟VWFサブユニットの配列と同じであれば「野生型」であり、異なっていれば「変異」したものである。

また、本明細書において、ヒト起源でないことを特記しないかぎり、VWFはヒト起源のものである。ヒト以外の生物を起源とするVWFは、本明細書においては「変異」したものに含められる。  
25

本明細書において「ポリペプチド」はアミノ酸残基が2よりも多いペプチドをいう。さらに本明細書において「ポリペプチド」と「蛋白」または「蛋白質」なる語は同義として扱う。

本明細書においてアミノ酸は慣用的な3文字標記とする。

本発明は、1の態様において、配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸764から1605のうちの1つから始まり、アミノ酸1606から2813のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド（ただし、配列表の配列番号：1のアミノ酸764から始まり、アミノ酸2813で終わるものを除く）を提供する。

本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドは切断部位Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>を必須として含むヒト成熟VWFサブユニットの部分アミノ酸配列である。したがって、アミノ酸764から始まり、アミノ酸2813で終わる全長の野生型ヒト成熟VWFサブユニットは除かれる。

配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459（Asp）からアミノ酸1668（Arg）までの領域はCys残基を含まないので、ジスルフィド結合の形成により多量体化することがなく、ADAMTS-13に対する特異性、ADAMTS-13活性測定の定量性、再現性、取り扱い等に問題を生じることがない。したがって、本発明は、好ましい態様において、配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459から1605のうちの1つから始まり、アミノ酸1606から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチドを提供する。

また、切断部位の前後アミノ酸4個までの短いポリペプチドはADAMTS-13基質として特異性があまり高くない。したがって、本発明は、より好ましい態様において、配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459から1600のうちの1つから始まり、アミノ酸1611から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチドを提供する。この態様のADAMTS-13基質ポリペプチドは、上述のごとくCys残基を含まないので、ジスルフィド結合の形成により多量体化することがなく、ADAMTS-13に対する特異性、ADAMTS-13活性測定の定量性、再現性、取り扱い等に問題を生じることがなく、この態様のADAMTS-13ポリペプチドは組み換え法による製造に十分に適した小型のものであり、ADAMTS-13に対する特異性も高い。



本発明は、さらに好ましい態様において、配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1554から1600のうちの1つから始まり、アミノ酸1660から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチドを提供する。上述のごとく、この態様のADAMTS-13基質ポリペプチドはCys残基を含まないので、ジスルフィド結合の形成により多量体化することがなく、ADAMTS-13に対する特異性、ADAMTS-13活性測定の定量性、再現性、取り扱い等に問題を生じることがなく、この態様のADAMTS-13基質ポリペプチドは上記態様のものよりも小型なので組み換え法による製造に特に適している。また、この態様のADAMTS-13基質ポリペプチドは上記態様のものよりもADAMTS-13に対する特異性がさらに高い（実施例のセクション参照）。

本発明は、特に好ましい具体例として、配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1587から始まり、アミノ酸1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチド、ならびに配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1596から始まり、アミノ酸1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチドを提供する。

本発明のこれらのADAMTS-13基質ポリペプチドはADAMTS-13によりTyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>間が切断される。

さらに、本発明は、さらなる態様において、上記態様のいずれかのADAMTS-13基質ポリペプチドに対して少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを提供する。

好ましくは、変異ADAMTS-13基質ポリペプチドは切断部位Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>をその中に含む。しかしながら、変異ADAMTS-13基質ポリペプチドは、ADAMTS-13に対する特異性を保持する限り、切断部位の2つのアミノ酸が上記のもの（Tyr<sup>1605</sup>、Met<sup>1606</sup>）と異なってもよく、かかる変異ADAMTS-13基質ポリペプチドも本発明に包含される。

アミノ酸配列の「相同性」とは、比較される2つまたはそれ以上のアミノ酸配列が同一または類似のアミノ酸配列を有する度合いをいう。本発明の変異ADA

MTS-13基質ポリペプチドの場合には、野生型のものに対して100%同一のアミノ酸配列を有するものは除かれる。

さらに好ましくは、本発明の変異ADAMTS-13基質ポリペプチドは、上記ADAMTS-13基質ポリペプチドのアミノ酸配列において、1個ないし数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加（あるいはこれらの組み合わせ）により、上記ADAMTS-13基質ポリペプチドとは異なっているものである変異ADAMTS-13基質ポリペプチドである。

変異アミノ酸配列は上記のものであればいかなるものであってもよく、好ましくは、例えば、野生型アミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸が、欠失、挿入、置換または付加されたものであってもよく（これらの組み合わせであってもよい）、あるいは野生型アミノ酸配列中の1またはそれ以上のアミノ酸の側鎖が修飾されたもの（例えば、合成非天然アミノ酸）であってもよく、あるいはこれらの組み合わせであってもよい。

これらの変異は自然発生的な突然変異によるものであってもよく、あるいは人為的な突然変異誘発によるものであってもよい。人為的な突然変異誘発法は当該分野においてよく知られており、例えば、組み換え法を用いた部位特異的突然変異誘発法、化学的方法による変異ポリペプチドの合成、例えば固相合成および液相合成、またはアミノ酸残基の化学修飾等があり、それぞれの詳細は当業者のよく知るところである。また、かかる変異および／または修飾の位置はいずれの位置におけるものであってもよい。

アミノ酸の修飾例としては、アセチル化、アシル化、アミド化、糖鎖付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の付加、脂質または脂質誘導体の付加、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、架橋形成、シスチン形成、ピログルタミン酸形成、ホルミル化、ヒドロキシル化、ハロゲン化、メチル化、側鎖の酸化、蛋白加水分解酵素による処理、リン酸化、硫酸化、ラセミ化等があり、当該分野においてよく知られている。

特に、真核細胞発現系において本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドを製造した場合には、ポリペプチド中のセリンまたはスレオニン残基において糖鎖付加される可能性が高く、このように真核細胞において発現されて糖鎖付加さ

れたADAMTS-13基質ポリペプチドも本発明に含まれる。

次に、上記の本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドの製造方法について説明する。以下の説明は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドの製造についてのものであるが、以下の説明が変異ADAMTS-13基質ポリペプチドの製造についても適用できることは当業者に明らかである。

化学合成による場合は、固相または液相ペプチド合成が一般的である。例えば、固相ペプチド合成装置を用いることもできる。アミノ酸残基の修飾が必要な場合には、適宜、修飾アミノ酸を合成装置に導入することもできる。合成中に感受性の高い残基に保護基を導入することも公知である。また、アミノ酸配列が得られた後、修飾を行なってもよい。いうまでもなく、これらの化学合成法および他の化学合成法は当該分野において公知であり、当業者は適切な方法を選択して目的ポリペプチドを合成することができる。

あるいは、本発明のポリペプチドを含有するポリペプチドを適当なプロテアーゼおよび／またはペプチダーゼで切断することによって製造することもできる。例えば、血漿からVWF画分を精製し、特異的な切断部位を有するプロテアーゼおよび／またはペプチダーゼを作用させてもよい。

得られたポリペプチドを単離・精製する方法も当該分野においてよく知られており、例えば、各種クロマトグラフィー、塩析、電気泳動、限外濾過等の方法がある。

組み換え法により本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドを製造することもできる。組み換え法によるポリペプチドの製造は当業者に公知の方法、例えばSambrookらのMolecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載された方法により行うことができるが、以下に典型例を示す。

まず、本発明のポリペプチドをコードするDNAをクローニングする。DNAクローニングの手段としては、例えば、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、当該分野で公知の方法、例えばPCR法により増幅することができる。クローン化されたDNAを適切な発現ベクター中に連結し、適切な宿主中に導入して宿主を形質転換させ、形質転換宿主を培養す

ることにより発現されたポリペプチドを得ることができる。クローン化されたDNAを適切な発現ベクター中に連結する際に、適切なプロモーターの下流に連結して発現を促進し、ポリペプチドを多く得ることが好ましい。なお、ヒトVWFのヌクレオチド配列は、例えば、GenBank受託番号NM\_000552としてデータベースに登録されており、利用可能である。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13等）、枯草菌由来のプラスミド（例えば、pUB10、pTP5、pC194等）、酵母由来のプラスミド（例えば、pSH19、pSH15等）、バクテリオファージ（例えば、 $\lambda$ ファージ等）、バキュロウイルス、動物ウイルス（例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス等）、あるいはpA1-11、pXXT1、pRc、pcDNA1等がある。これらのベクターおよび他のベクターは当業者によく知られており、市販されているものも多い（例えば、アマシャム・バイオサイエンス社から市販されているpGEX-6P-1は、タグ蛋白であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合蛋白を発現させるベクターである）。

宿主としては、細菌細胞、例えば大腸菌（例、K12株、HB101株、JM103株、JA221株、C600株、BL21株等）、枯草菌、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、エンテロコッカス属；真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属細胞；昆虫細胞、例えばドロソフィラS2およびスポドプテラSf9細胞；動物細胞、例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293細胞等の動物細胞；ならびに植物細胞等がある。

プロモーターとしては、目的ポリペプチドをコードするDNAの発現に用いる宿主に適したものであればよく、大腸菌宿主の場合には、例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター等が用いられ、枯草菌宿主の場合には、例えばSPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等が用いられ、酵母宿主の場合には、例えばPHO5プロモーター、PGKプロモーター等が用いられ、昆虫宿主の場合には、例えばP10プロモーター、ポリヘドロンプロモーター等が用いられ、動物細胞宿主の場合には、例えばSV40初期プロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、CMVプロモーター等が用い

られる。

発現ベクターは、所望により、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ  
A付加シグナル、選択マーカー（抗生物質耐性遺伝子（例、メトトレキセート耐  
性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等）、ジヒドロ葉  
5 酸還元酵素遺伝子等）をさらに含んでもよい。

宿主細胞の形質転換は上記Sambrookらのテキストをはじめとする多くのテキス  
トにある方法により行なうことができ、例えばリン酸カルシウム法、DEAEー  
デキストランを用いる方法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーショ  
ン、ウイルス感染等がある。

10 形質転換体を培養する際、使用される培地としては液体培地が適当であり、そ  
れぞれの宿主の種類に応じて好ましい培地組成、培養条件が当該分野において公  
知であり、当業者はこれらの培地組成、培養条件を選択できる。

15 翻訳ポリペプチドを、小胞体内腔、ペリプラスミックススペースまたは細胞外環  
境へ分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現するポリペプチドに組み込む  
ことができる。これらのシグナルはポリペプチドに本来的なものであってもよく、  
あるいは異種性のシグナルでもよい。

20 発現された組み換えポリペプチドは周知の方法により、組換え細胞培養物から  
回収および精製でき、その方法には、例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール  
沈殿、有機溶媒による沈殿、電気泳動、限外濾過、陰イオンまたは陽イオン交換  
クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用ク  
ロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマ  
トグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィー等がある。高速液体クロマトグ  
ラフィーを精製に用いるのが好ましい。ポリペプチドが単離および／または精製  
25 中に変性した場合、例えば、細菌中の封入体として産生された場合、再び活性な  
コンホーメーションにするために、ポリペプチド再生のための公知の技法、例え  
ば尿素処理を用いることができる。

以下に、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMT  
S-13基質ポリペプチドの活性測定、ならびにそれらを含む診断組成物または  
キット等について説明する。以下の説明はADAMTS-13基質ポリペプチド

に関するものであるが、以下の説明が変異ADAMTS-13基質ポリペプチドについても適用できることは当業者に明らかである。

対象におけるADAMTS-13活性は、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドを用いて、例えば、以下のようにして測定することができる。適当な  
5 反応条件下において、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドと正常対象から得た血漿とを接触させて、生成するポリペプチド断片を例えばSDS-ポリ  
アクリルアミドゲル（以下、「SDS-PAGE」という）により分析し、これ  
を対照とし、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドと対象から得た血漿  
とを接触させて同様にSDS-PAGEを行なった後クーマシーブルーあるいは  
10 銀染色等で蛋白を染色して生成物を分析し、バンド位置、濃さ等を対照と比較す  
る。あるいはSDS-PAGEからウェスタンブロッティングを行なってもよい。  
なお、反応液は、ADAMTS-13の活性化因子である $Ba^{2+}$ などの2価金  
属イオンを含み、さらにADAMTS-13の至適pH8ないし9の緩衝液を含  
むことが好ましい。

したがって、本発明は、上記のごとく本発明のADAMTS-13基質ポリペ  
15 プチドに対象から得た血漿を接触させ、反応生成物を分析することを特徴とする、  
対象血漿中のADAMTS-13活性測定方法に関する。

また、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドを含む、対象におけるA  
DAMTS-13活性の低下または欠失、ひいてはTTPの存在またはTTP素  
20 質、あるいはTTPの確定診断およびTTPとHUSとの識別をインビトロで調  
べるための診断組成物にも関する。さらに本発明は、本発明のADAMTS-1  
3基質ポリペプチドを必須構成成分として含む、対象におけるADAMTS-1  
3活性の低下または欠失、ひいてはTTPの存在またはTTP素質、あるいはT  
TPの確定診断およびTTPとHUSとの識別をインビトロで調べるためのキッ  
25 トにも関する。キットには取扱説明書を添付するのが通例である。

本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13  
基質ポリペプチドは、そのN末端および／またはC末端にタグ配列が結合してい  
てもよい。以下の説明はADAMTS-13基質ポリペプチドに関するものであ  
るが、変異ADAMTS-13基質ポリペプチドに関しても同様にタグを付すこ

とができ、同様に使用できることは、当業者に明らかである。タグ配列はいかなるものであってもよいが、ADAMTS-13による切断生成物の検出、定量、分離等を容易化させるものが好ましい。また、タグ配列は、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドを固相に固定化するためのものであってもよい。この  
5 ようなタグ配列を用いて固相に固定化されたADAMTS-13基質ポリペプチドも本発明に包含される。タグ配列としては、蛋白（例えば、グルタチオントランスフェラーゼ（以下、「GST」という）、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等）、ペプチド（例えば、Hisタグ等）、カップリング剤（カルボジイミド試薬等）、各種標識（例えば、放射性標識、発色団、酵素等）等があり、当  
10 業者は目的に応じて、タグの種類を選択することができる。また、タグ付加方法も当業者のよく知るところである。

例えば、実施例1で詳述するように、大腸菌発現ベクターpGEX-6P-1に、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドをコードするDNAを挿入し、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドのN末端にタグとしてGSTが融合した融合蛋白を得てもよい。その際、例えばグルタチオンセファロースカラム  
15 を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる。例えばGST蛋白のごとき高分子物質を融合させておくと、反応後、分子量が大きく異なる2つの断片を分析すればよく、例えば反応生成物をSDS-PAGEにおいて分離し、解析することが容易となる。また、上記の例において抗GST抗体  
20 が使用できる場合には、これを用いてウェスタンブロットを行なうこともできる。

また、例えば、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドのC末端にタグ配列としてルシフェラーゼやガラクトシダーゼを融合させておき、N末端にGSTを融合させておく。グルタチオンビーズ等で融合蛋白をトラップし、ADAMTS-13での切断後に遊離したタグ付き生成物を、公知のルシフェラーゼある  
25 いはガラクトシダーゼ活性測定方法により定量することにより、ADAMTS-13活性を定量することもできる。

さらに、タグ配列としては、公知のHisタグや抗Mycタグ等も使用できる。例えば、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドのN末端にHisタグを付加して固相に固定化し、C末端にセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）

標識した抗My c タグを付加しておく。ADAMTS-13との反応後、液相に遊離したHRPを公知の方法で比色定量することにより、ADAMTS-13活性を測定することができる。

さらに以下のような具体例も本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドにタグを付したものと考えられる。すなわち、活性測定法が確立されている既知蛋白を選択し、該既知蛋白の活性を保持するように該既知蛋白のアミノ酸配列中に本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドのアミノ酸配列を挿入して融合蛋白を得る。この融合蛋白を対象から得た血漿と反応させ、血漿中のADAMTS-13活性により切断部位が切断されると元の既知蛋白の活性も消失するようにしておく。このような融合蛋白を用いて、その活性の消失の程度を調べることでより血漿中のADAMTS-13活性を測定することもできる。

また、本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドは、例えば、検出を可能または容易にするタグを付する、あるいは固相に固定化する等により、ハイスループット化されたADAMTS-13活性測定に適したものとすることもできる。したがって、本発明は、好ましくはタグの付いた本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを用いることを特徴とする、対象から得た血漿中のADAMTS-13活性についての活性測定法、好ましくはハイスループット化された測定方法にも関する。また本発明は、タグの付いた本発明のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを含む血漿ADAMTS-13活性測定用組成物またはキットにも関する。

さらなる態様において、本発明は、上記診断組成物または上記キットを製造するための、上記のいずれかのADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドの使用に関するものである。

## 実施例

### A. ADAMTS-13基質ポリペプチドの製造

上述のごとく、ADAMTS-13はVWFのTyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>間のペプチド結合を特異的に切断する。しかしながら、実際にはVWFは成熟サブユ



ニットが多数会合して巨大分子化しており、従来の測定法のように、これをそのまま基質として使用したのでは定量性、再現性、操作性等に問題を生じる。本発明において、ADAMTS-13の酵素活性測定は、この切断部位の周辺配列を含む成熟VWFサブユニットの部分配列を基質として利用することとして、かかる問題を解決した。

ADAMTS-13の基質特異性を維持するためには、一般的には、部分配列は一定の長さを有するものとすべきであろうが、大腸菌による組み換え発現による製造に適したものとするためには部分配列は小さいほうがよい。また、基質として使用する場合、SH基を有するシステイン残基がポリペプチド中に存在すると、これにより多量体化し、定量性、取り扱い、再現性等に問題を生じるので、部分配列としてはシステイン残基を含まない領域が望ましい。このような条件を満たすものの1つとして、ポリペプチドAsp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>を選択した。すなわち、この領域は切断部位を含み、かつCys残基を含まない最大のサイズの領域である。

市販のヒト臍帯静脈内皮細胞より抽出したRNAを鋳型にしてRT-PCRを行い、VWFサブユニットのAsp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>領域（配列番号：2）をコードするcDNAを得た。このとき使用したセンス方向のプライマーは5'-cgggatccGACCTTGCCCC TGAAGCCCCTC-3'（配列番号：7）、アンチセンス方向のプライマーは5'-cgg aattcTCAGTGATGGTGATGGTGATGCCTCTGCAGCACCAGGTCAGGA-3'

（配列番号：8）であった（小文字部分は、サブクローニングのために付加した制限酵素認識部位を示す）。アンチセンス方向のプライマーには6xHisタグ配列を付加してある。これをBamHIおよびEcoRIで切断処理した後、同じくBamHIおよびEcoRIで切断処理した大腸菌発現ベクターpGEX-6P-1（アマシャム・バイオサイエンス社）に挿入した。すなわち、VWFサブユニットのAsp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>領域のN端側にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）が、C端側に6xHisタグ配列が結合した融合蛋白質（以下、GST-Asp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hと表記）が発現されるようにした。得られた発現プラスミドを大腸菌BL21株に導入し、IPTG誘導によって一過性に発現させ、ニッケル親和性クロマトグラフィーとグルタチオン親和性クロマトグラフィーで精製して、融合蛋白GST-Asp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hを得

た。

さらに、上記のものよりも短いポリペプチドは大腸菌などを用いた組み換え法による製造にさらに適したものである。そこで、Glu<sup>1554</sup>-Arg<sup>1668</sup>（配列番号：3）、Asp<sup>1587</sup>-Arg<sup>1668</sup>（配列番号：4）、Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>（配列番号：5）および Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1659</sup>（配列番号：6）領域をコードするcDNAを得るために3種類のセンス方向プライマー5'-cgggatccGAGGCACAGTCCAAAGGGGACA-3'（配列番号：9）、5'-cgggatccGACCACAGCTTCTTGGTCAGCC-3'（配列番号：10）、5'-cgggatccGACCGGGAGCAGGCGCCCAACC-3'（配列番号：11）と1種類のアンチセンス方向プライマー5'-cggaattcTCAGTGATGGTGATGGTGA TGTCGGGGGAGCGTCTCAAAGTCC3'（配列番号：12）を用い、これらを組み合わせて同様の過程を行い、4種類の融合蛋白質GST-Glu<sup>1554</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1587</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1659</sup>-Hが発現されるプラスミドも作成した。これら発現プラスミドを大腸菌BL21株に導入し、IPTG誘導によって一過性に発現させ、ニッケル親和性クロマトグラフィーとグルタチオン親和性クロマトグラフィーで精製して、各融合蛋白を得た。

このようにして得た5種類の融合蛋白質GST-Asp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Glu<sup>1554</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1587</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1659</sup>-Hは、ADAMTS-13によって特異的に切断された場合、すなわち、VWFサブユニットのTyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup>間に相当する部位で切断された場合、それぞれ43.1 kDa（GST部分を含む）と7.7 kDa（His6タグ配列部分を含む）の断片、32.7 kDaと7.7 kDaの断片、29.0 kDaと7.7 kDaの断片、28.0 kDaと7.7 kDaの断片、28.0 kDaと6.7 kDaの断片に分離するはずである。

#### B. ADAMTS-13 基質ポリペプチドと血漿ADAMTS-13 との反応

これら融合蛋白質を、正常血漿0.25  $\mu$ Lと37°Cで0時間あるいは2時間反応させた。反応液総容量は20  $\mu$ Lで、25 mM Tris (pH 8.0)、10 mM BaCl<sub>2</sub>、4 mM グルタチオン、1 mM APMSFを含んでいた。これをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、抗GST抗体を一次抗体として用いたウェスタンブロットを行った。結果を図1に示す。

2時間反応させた場合、GST-Asp<sup>1587</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hでは予想さ

れた断片（図中の矢頭）が明確に生じた。一方、それよりも領域の長いGST-Glu<sup>1554</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hでも予想位置に非常に薄いバンドが生じた。さらに領域の長いGST-Asp<sup>1459</sup>-Arg<sup>1668</sup>-H、あるいは領域の短いGST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1669</sup>-Hでは断片が生じない、あるいは生じにくいことがわかった。つまり、GST-Asp<sup>1587</sup>-Arg<sup>1668</sup>-HとGST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-HはADAMTS-13の基質として適していることが示唆された。

### C. ADAMTS-13 基質ポリペプチドの基質特異性および反応の定量性

次に、Bで得られた特に好ましいADAMTS-13 基質ポリペプチドのうち、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hの基質としての特異性を調べるため、TTP患者家族の血漿と反応させた。反応条件および検出方法は上述と同じである。結果を図2に示す。

2名の患者血漿それぞれとGST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hを反応させた場合、正常血漿との反応で生じる断片（図中の矢頭）は検出されなかった。一方、別の方法でADAMTS-13の活性が正常血漿の約半分しかないことがわかっている家族Aの母と姉、家族Bの父と母の血漿では、正常血漿よりも少ない量の断片が生じた。さらに活性が低いことがわかっている家族Aの父の血漿では、より少ない量の断片しか生じなかった。以上の結果から、GST-Asp<sup>1596</sup>-Arg<sup>1668</sup>-Hは血漿中のADAMTS-13で定量的に切断され、かつ、他の酵素では切断されない、特異的な人工基質であることが示唆された。

### 産業上の利用の可能性

本発明のADAMTS-13 活性測定用基質ポリペプチドは、基質特異性を維持しつつも、大腸菌による組み換え発現による製造に適した小型のものである。また、SH基を有するシステイン残基がポリペプチド中に存在しないので、多量体化の問題を回避でき、定量性、取り扱い、再現性等に関しても問題を生じることが少ない。したがって、本発明のADAMTS-13 活性測定用基質ポリペプチドにより、簡便で、特異的で、定量性、再現性が良く、感度の高いADAMTS-13 活性測定が可能となる。また本発明のADAMTS-13 活性測定用基質は多検体処理能にも適する。例えば、本発明のADAMTS-13 活性測定用基質を固定化、標識する等により多検体処理能を行うこともできる。

本発明によりTTPの効果的な治療およびTTP発症予知が可能となる。具体

的には、本発明によって、TTP発症の副作用を持つ薬剤の服用時や、TTPを誘発しやすい妊娠時等に血中ADAMTS-13活性を定期的に測定し、それが低下していないかどうか、すなわち、TTP発症の徴候が現れていないかどうか、といった臨床情報を得ることが可能となる。また、本発明は、ADAMTS-13活性と種々の疾患との関連を疫学的研究で明らかにするための強力な道具となる。また、本発明により患者がTTPにかかっていることの迅速な確定診断を行なうこともできる。さらに本発明により患者のADAMTS-13活性を的確に測定することができるので、TTPとHUSとを識別することもできる。

#### 10 配列表フリーテキスト

配列番号：1は野生型ヒトVWFのアミノ酸配列を示す。

配列番号：2は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
A s p<sup>1459</sup>—A r g<sup>1668</sup>のアミノ酸配列を示す。

15 配列番号：3は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
G l u<sup>1554</sup>—A r g<sup>1668</sup>のアミノ酸配列を示す。

配列番号：4は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
A s p<sup>1587</sup>—A r g<sup>1668</sup>のアミノ酸配列を示す。

配列番号：5は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
A s p<sup>1596</sup>—A r g<sup>1668</sup>のアミノ酸配列を示す。

20 配列番号：6は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
A s p<sup>1596</sup>—A r g<sup>1659</sup>のアミノ酸配列を示す。

配列番号：7は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
A s p<sup>1459</sup>—A r g<sup>1668</sup>を製造するために使用したセンスプライマーのヌクレ  
オチド配列を示す。

25 配列番号：8は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
A s p<sup>1459</sup>—A r g<sup>1668</sup>を製造するために使用したアンチセンスプライマーの  
ヌクレオチド配列を示す。

配列番号：9は本発明のADAMTS-13基質ポリペプチド  
G l u<sup>1554</sup>—A r g<sup>1668</sup>、A s p<sup>1587</sup>—A r g<sup>1668</sup>、

Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1659</sup>を製造するために使用したセンスプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：10は本発明のADAMTS—13基質ポリペプチド

Glu<sup>1554</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1587</sup>—Arg<sup>1668</sup>、

5 Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1659</sup>を製造するために使用したセンスプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：11は本発明のADAMTS—13基質ポリペプチド

Glu<sup>1554</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1587</sup>—Arg<sup>1668</sup>、

10 Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1659</sup>を製造するために使用したセンスプライマーのヌクレオチド配列を示す。

配列番号：12は本発明のADAMTS—13基質ポリペプチド

Glu<sup>1554</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1587</sup>—Arg<sup>1668</sup>、

15 Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1668</sup>、Asp<sup>1596</sup>—Arg<sup>1659</sup>を製造するために使用したアンチセンスプライマーのヌクレオチド配列を示す。

#### 参考文献

1) Levy GG et al. Nature 2001; 413:488-494

2) Dent JA et al. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:6306-6310

3) Furlan M et al. Blood 1996; 87:4223-4234

20 4) Gerritsen H et al. Thromb Haemost 1999; 82:1386-1389

5) Obert B et al. Thromb Haemost 1999; 82:1382-1385

6) Furlan M et al. Seminars in Thromb and Hemost 2002; 28(2):167-171

## 請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸764から1605のうちの1つから始まり、アミノ酸1606から2813のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド（ただし、配列表の配列番号：1のアミノ酸764から始まり、アミノ酸2813で終わるものを除く）。
2. 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459から1605のうちの1つから始まり、アミノ酸1606から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド。
3. 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1459から1600のうちの1つから始まり、アミノ酸1611から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド。
4. 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1554から1600のうちの1つから始まり、アミノ酸1660から1668のうちの1つで終わるADAMTS-13基質ポリペプチド。
5. 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1587から始まり、アミノ酸1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチド。
6. 配列表の配列番号：1に示された野生型ヒトVWFのアミノ酸配列のアミノ酸1596から始まり、アミノ酸1668で終わるADAMTS-13基質ポリペプチド。
7. 請求項1ないし6のいずれか1項に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドに対して少なくとも50%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。
8. 請求項1ないし6のいずれか1項に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドに対して少なくとも70%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。
9. 請求項1ないし6のいずれか1項に記載のADAMTS-13基質ポリペ

プチドに対して少なくとも90%以上のアミノ酸配列相同性を有する変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。

10. 請求項1ないし6のいずれか1項に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドのアミノ酸配列において、1個ないし数個のアミノ酸の欠失、挿入、置換または付加（あるいはこれらの組み合わせ）により、請求項1ないし6のいずれか1項に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドとは異なっているものである変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。

11. N末端および/またはC末端にタグ配列が結合している請求項1ないし10のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。

12. タグが蛋白、ペプチド、カップリング剤、放射性標識、発色団からなる群より選択されるものである請求項11記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。

13. タグが固相に固定化するためのものである請求項11または12に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。

14. 固相に固定化された請求項13記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチド。

15. 請求項1ないし14のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドと正常対象から得た血漿とを接触させて、生成するポリペプチド断片を分析してこれを対照とし、請求項1ないし14のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドと対象から得た血漿とを接触させて生成するポリペプチド断片を同様に分析し、対照と比較することを特徴とする、対象中のADAMTS-13活性測定方法。

16. 請求項1ないし14のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを用いることを特徴とする、対象から得た血漿中のADAMTS-13活性のハイスループット測定方法。

17. 請求項1ないし14のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペ

プチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを含む、対象におけるADAMTS-13活性低下または欠失をインビトロで調べるための診断組成物。

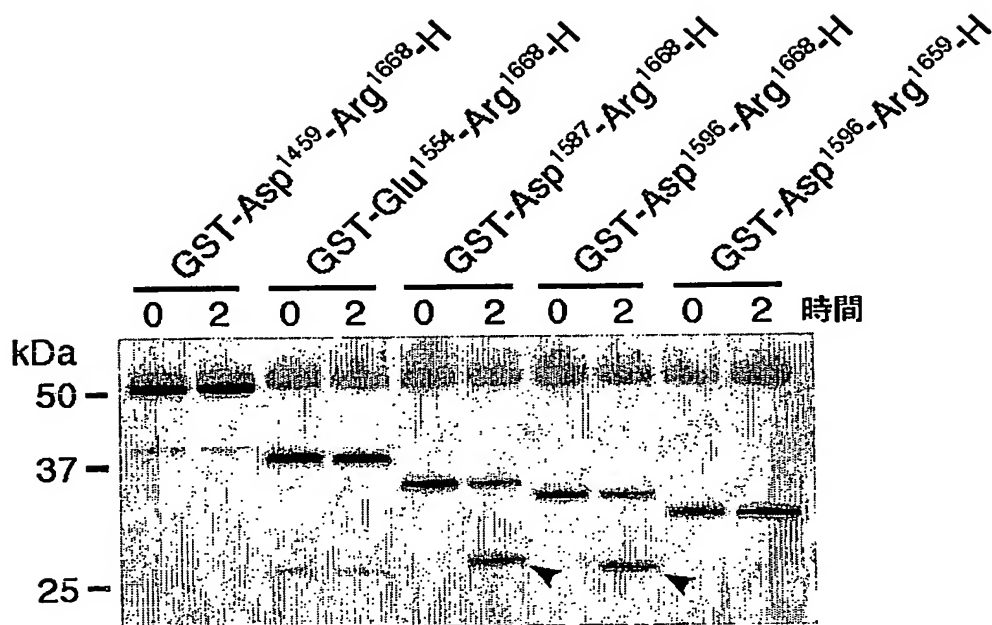
18. 請求項1ないし14のいずれかに記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドを必須構成成分として含む、対象におけるADAMTS-13活性低下または欠失をインビトロで調べるためのキット。

19. 請求項17記載の診断組成物または請求項18記載のキットを製造するための、請求項1ないし14のいずれか1項に記載のADAMTS-13基質ポリペプチドまたは変異ADAMTS-13基質ポリペプチドの使用。



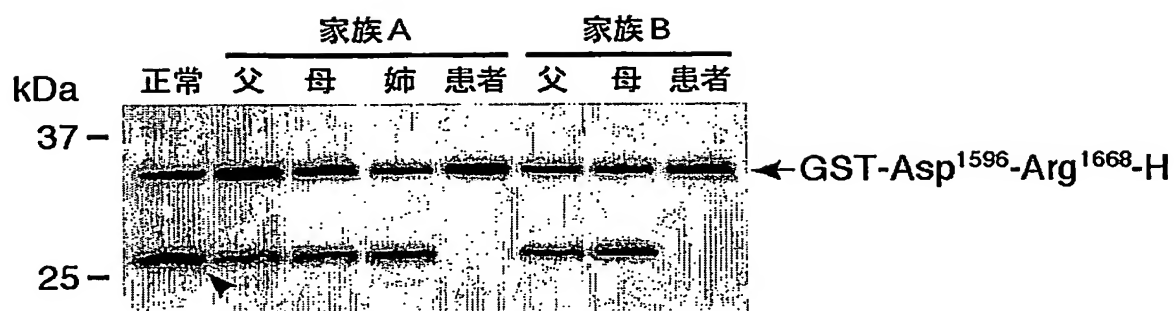
1/2

図 1



2/2

图 2



1/20  
SEQUENCE LISTING

<110> Japan As Represented by the President of National Cardiovascular  
Center

5

<120> A specific substrate and a method for determining activity of von  
Willebrand factor cleaving enzyme

<130> 663477

10

<160> 12

<210> 1

<211> 2813

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile

20

1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr

20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly

35 40 45

25

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly

50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys

65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu

2/20

	85	90	95	
	Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro			
	100	105	110	
	Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys			
5	115	120	125	
	Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly			
	130	135	140	
	Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly			
	145	150	155	160
10	Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln			
	165	170	175	
	Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala			
	180	185	190	
	Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser			
15	195	200	205	
	Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln			
	210	215	220	
	Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu			
	225	230	235	240
20	Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu			
	245	250	255	
	Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala			
	260	265	270	
	Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His			
25	275	280	285	
	Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys			
	290	295	300	
	Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met			
	305	310	315	320

3/20

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu

325

330

335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His

340

345

350

5 Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn

355

360

365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys

370

375

380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp

10 385

390

395

400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg

405

410

415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys

420

425

430

15 Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu

435

440

445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val

450

455

460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu

20 465

470

475

480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu

485

490

495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu

500

505

510

25 Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn

515

520

525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro

530

535

540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln

4/20

	545		550		555		560									
	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	Asn	Pro	Arg	Met
			565					570							575	
	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe
5			580					585							590	
	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr	Leu	Arg	Asn	Cys
			595					600							605	
	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Cys	Leu	Cys	Gly
			610					615							620	
10	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg	Val
			625					630							635	
	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly	Gln
								645							650	
	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Leu
15			660					665							670	
	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys	Phe
			675					680							685	
	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Tyr	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys
			690					695							700	
20	Ala	Gln	Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp
			705					710							715	
	Ile	Phe	Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met
								725							730	
	His	Cys	Thr	Met	Ser	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Val
25			740					745							750	
	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg
			755					760							765	
	Pro	Pro	Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu
			770					775							780	

5/20

	Gly	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Leu	Glu	Cys	Met
	785					790					795					800
	Ser	Met	Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	Gly	Met	Val	Arg
					805					810					815	
5	His	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Cys	Pro	Cys	Phe	His	Gln
					820					825					830	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr
					835					840					845	
	Cys	Val	Cys	Arg	Asp	Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	Asp	His	Val	Cys	Asp
10		850					855					860				
	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr	Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly
	865					870					875				880	
	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe	Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Gln	Asp
					885					890					895	
15	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys
					900					905					910	
	Gly	Cys	Ser	His	Pro	Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu
					915					920					925	
	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Lys
20		930					935					940				
	Arg	Pro	Met	Lys	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Arg
	945					950				955					960	
	Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Trp	Asp	Arg
					965					970					975	
25	His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val
					980					985					990	
	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr
					995					1000					1005	
	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn	Ser

6/20

	1010	1015	1020
	Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro Leu Asp		
	1025	1030	1035 1040
	Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln Thr Met Val		
5	1045	1050	1055
	Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe Gln Asp Cys Asn		
	1060	1065	1070
	Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val Cys Ile Tyr Asp Thr		
	1075	1080	1085
10	Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys Phe Cys Asp Thr Ile		
	1090	1095	1100
	Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly Lys Val Val Thr Trp		
	1105	1110	1115 1120
	Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg		
15	1125	1130	1135
	Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala		
	1140	1145	1150
	Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln		
	1155	1160	1165
20	Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp		
	1170	1175	1180
	Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu		
	1185	1190	1195 1200
	Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro		
25	1205	1210	1215
	Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu		
	1220	1225	1230
	Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr		
	1235	1240	1245



7/20

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser Glu  
1250 1255 1260

Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu Val Phe  
1265 1270 1275 1280

5 Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe Glu Val Leu  
1285 1290 1295

Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg Ile Ser Gln Lys  
1300 1305 1310

Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp Gly Ser His Ala Tyr  
10 1315 1320 1325

Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu Leu Arg Arg Ile Ala  
1330 1335 1340

Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala Ser Thr Ser Glu Val  
1345 1350 1355 1360

15 Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu  
1365 1370 1375

Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg  
1380 1385 1390

Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys  
20 1395 1400 1405

Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln  
1410 1415 1420

Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu  
1425 1430 1435 1440

25 Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr  
1445 1450 1455

Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His  
1460 1465 1470

Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu

8/20

	1475	1480	1485	
	Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu Glu			
	1490	1495	1500	
	Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe			
5	1505	1510	1515	1520
	Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His			
	1525	1530	1535	
	Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe			
	1540	1545	1550	
10	Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile			
	1555	1560	1565	
	Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr			
	1570	1575	1580	
	Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala			
15	1585	1590	1595	1600
	Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile			
	1605	1610	1615	
	Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro			
	1620	1625	1630	
20	Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro			
	1635	1640	1645	
	Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu			
	1650	1655	1660	
	Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu			
25	1665	1670	1675	1680
	Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu			
	1685	1690	1695	
	Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser			
	1700	1705	1710	

9/20

Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr

1715

1720

1725

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro

1730

1735

1740

5 Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val

1745

1750

1755

1760

Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe

1765

1770

1775

Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala

10 1780

1785

1790

Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val

1795

1800

1805

Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro

1810

1815

1820

15 Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala

1825

1830

1835

1840

Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp

1845

1850

1855

Leu Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys

20 1860

1865

1870

Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg

1875

1880

1885

Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys

1890

1895

1900

25 Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Thr His Arg Val Asn Cys Asp

1905

1910

1915

1920

Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val

1925

1930

1935

Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly

10/20

	1940	1945	1950	
	Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu			
	1955	1960	1965	
	Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu			
5	1970	1975	1980	
	Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly			
	1985	1990	1995	2000
	Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu			
	2005	2010	2015	
10	His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro			
	2020	2025	2030	
	Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His			
	2035	2040	2045	
	Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln			
15	2050	2055	2060	
	Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys			
	2065	2070	2075	2080
	Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe			
	2085	2090	2095	
20	Met Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln			
	2100	2105	2110	
	Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu			
	2115	2120	2125	
	Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu			
25	2130	2135	2140	
	Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr			
	2145	2150	2155	2160
	Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val			
	2165	2170	2175	

11/20

Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp  
2180 2185 2190

Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
2195 2200 2205

5 Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn Val  
2210 2215 2220

Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp  
2225 2230 2235 2240

Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln  
10 2245 2250 2255

Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val  
2260 2265 2270

Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys  
2275 2280 2285

15 Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys  
2290 2295 2300

Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys  
2305 2310 2315 2320

Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro  
20 2325 2330 2335

Val Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly  
2340 2345 2350

Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys  
2355 2360 2365

25 Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg  
2370 2375 2380

Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn  
2385 2390 2395 2400

Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn

12/20

	2405	2410	2415
	Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val		
	2420	2425	2430
	His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys		
5	2435	2440	2445
	Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu Arg		
	2450	2455	2460
	Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly		
	2465	2470	2475
10	2480		
	Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro		
	2485	2490	2495
	Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser		
	2500	2505	2510
	Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys		
15	2515	2520	2525
	Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln		
	2530	2535	2540
	Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly		
	2545	2550	2555
20	2560		
	Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys		
	2565	2570	2575
	Glu Arg Met Glu Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly		
	2580	2585	2590
	Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln		
25	2595	2600	2605
	Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys		
	2610	2615	2620
	Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys		
	2625	2630	2635
			2640

13/20

Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly

2645

2650

2655

Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp

2660

2665

2670

5 Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys

2675

2680

2685

Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala Glu

2690

2695

2700

Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr Cys Glu

10

2705

2710

2715

2720

Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val

2725

2730

2735

Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly

2740

2745

2750

15 Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln

2755

2760

2765

Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val

2770

2775

2780

Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn

20

2785

2790

2795

2800

Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys

2805

2810

25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 210

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

14/20

&lt;400&gt; 2

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met Ala  
1 5 10 15  
Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro  
5 20 25 30  
Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser  
35 40 45  
Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu  
50 55 60  
10 Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr  
65 70 75 80  
Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu  
85 90 95  
Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr  
15 100 105 110  
Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser  
115 120 125  
Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn  
130 135 140  
20 Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg  
145 150 155 160  
Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala  
165 170 175  
Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu  
25 180 185 190  
Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu  
195 200 205  
Gln Arg  
210



15/20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg

1 5 10 15

10 Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu

20 25 30

Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro

35 40 45

Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys

15 50 55 60

Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn

65 70 75 80

Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile

85 90 95

20 Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val

100 105 110

Leu Gln Arg

115

25 &lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 82

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

16/20

&lt;400&gt; 4

Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn

1 5 10 15

Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg

5 20 25 30

Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala

35 40 45

Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu

50 55 60

10 Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu

65 70 75 80

Gln Arg

&lt;210&gt; 5

15 &lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

20 Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro

1 5 10 15

Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro

20 25 30

Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly

25 35 40 45

Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg

50 55 60

Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg

65 70

17/20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro

1 5 10 15

10 Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro

20 25 30

Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly

35 40 45

Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg

15 50 55 60

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> A sense primer used in RT-PCR for obtaining Asp1459-Arg1668 region  
of mature human VWF subunit

25

&lt;400&gt; 7

cgggatccga ccttgcccct gaagcccctc

30

&lt;210&gt; 8

18/20

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5 &lt;220&gt;

<223> An anti-sense primer used in RT-PCR for obtaining Asp1459-Arg1668 region of mature human VWF subunit

&lt;400&gt; 8

10 cggaattctc agtgatggtg atggtgatgc ctctgcagca ccaggtcagg a 51

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

15 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> A sense primer used in RT-PCR for obtaining Glu1554-Arg1668, Asp1587-Arg1668, Asp1596-Arg1668, and Asp1596-Arg1659 regions of mature human VWF subunit

20

&lt;400&gt; 9

cgggatccga ggcacagtcc aaaggggaca 30

25 &lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

19/20

&lt;220&gt;

<223> A sense primer used in RT-PCR for obtaining Glu1554-Arg1668, Asp1587-Arg1668, Asp1596-Arg1668, and Asp1596-Arg1659 regions of mature human VWF subunit

5

&lt;400&gt; 10

cgggatccga ccacagcttc ttggtcagcc 30

&lt;210&gt; 11

10 &lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

15 <223> A sense primer used in RT-PCR for obtaining Glu1554-Arg1668, Asp1587-Arg1668, Asp1596-Arg1668, and Asp1596-Arg1659 regions of mature human VWF subunit

&lt;400&gt; 11

20 cgggatccga cggggagcag gcgccaacc 30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

25 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> An anti-sense primer used in RT-PCR for obtaining Glu1554-Arg1668, Asp1587-Arg1668, Asp1596-Arg1668, and Asp1596-Arg1659 regions of

- 20/20

mature human VWF subunit

<400> 12

cggaattctc agtgatggtg atggtgatgt cgggggagcg tctcaaagtc c 51

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/10816

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/37, G01N33/53,  
G01N33/573, G01N33/58, G01N33/68, G01N33/96

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/37, G01N33/53,  
G01N33/573, G01N33/58, G01N33/68, G01N33/96

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST FILE (JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	REMUZZI, G. et al., von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome, Blood, 2002 Aug., Vol.100, No.3, pages 778 to 785	1, 7-19/2-4 /5-6
X/Y/A	VERWEJI, C.L. et al., Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit, EMBO J, 1986, Vol.5, No.8, pages 1839 to 1847	7-8/1-4, 9-19/5-6
Y/A	JENKINS, P.V. et al., Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease, Blood, 1998, Vol.91, No.6, pages 2032 to 2044	1-4, 7-19 /5-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document: defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
15 November, 2002 (15.11.02)

Date of mailing of the international search report  
10 December, 2002 (10.12.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/10816

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HE, S. et al., Are increased levels of von Willebrand factor in chronic coronary heart disease caused by decrease in von Willebrand factor cleaving protease activity? A study by an immunoassay with antibody against intact bond 842Tyr-843Met of the von Willebrand factor protein, Thromb Res., 2001, Vol.103, No.3, pages 241 to 248	1-19
A	HYLAND, L.J. et al., A radiometric assay for HIV-1 protease, Anal Biochem., 1990, Vol.188, No.2, pages 408 to 415	1-19



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/37, G01N33/53, G01N33/573, G01N33/58, G01N33/68, G01N33/96

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/37, G01N33/53, G01N33/573, G01N33/58, G01N33/68, G01N33/96

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	REMUIZZI, G. et al., von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome, Blood, 2002 Aug, Vol.100, No.3, p.778-785	1,7-19/2-4 /5-6
X/Y/A	VERWEIJ, C.L. et al., Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit, EMBO J, 1986, Vol.5, No.8, p.1839-1847	7-8/1-4,9-19 /5-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.11.02

国際調査報告の発送日

10.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

-日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	JENKINS, P. V. et al., Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease, Blood, 1998, Vol. 91, No. 6, p. 2032-2044	1-4, 7-19/5-6
A	HE, S. et al., Are increased levels of von Willebrand factor in chronic coronary heart disease caused by decrease in von Willebrand factor cleaving protease activity? A study by an immunoassay with antibody against intact bond 842Tyr-843Met of the von Willebrand factor protein, Thromb Res, 2001, Vol. 103, No. 3, p. 241-248	1-19
A	HYLAND, L. J. et al., A radiometric assay for HIV-1 protease, Anal Biochem, 1990, Vol. 188, No. 2, p. 408-415	1-19